

論 文 要 旨

**Neonatal maternal separation delays
the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch
by inhibiting KCC2 expression**

〔 新生児母子分離は KCC2 の発現を抑制することで、
GABA の興奮性から抑制性への機能スイッチを遅らせる 〕

古川 みなみ

【序論及び目的】

近年、幼少期ストレスは発達障害などの発症に関与することが報告されているが、その原因は不明である。また、中枢神経の主要な抑制物質である GABA は生後 1、2 週間で興奮性から抑制性へ機能変化することが知られている。これを GABA スイッチといい、正常な神経回路の構築に必須である。このことから、我々は育児放棄などの幼少期ストレスが GABA 機能に影響を与え、正常な神経回路の構築が出来ず、発達障害につながると考えた。本研究は、育児放棄モデルとして母子分離ストレスを用い、このストレスが GABA スイッチに与える影響を各種イメージング法にて解析し、行動解析を介して高次機能への影響を明らかにすることを目的とする。

【材料及び方法】

育児放棄モデルとして母子分離を行った。C57BL/6J 雄性新生児マウスをコントロール群と母子分離群に分け、母子分離群には生後 1 日から 21 日まで 1 日 3 時間の母子分離を行った。生後 7、14、21、35 日に脳を摘出し、GABA の機能に影響を与える共輸送体 (KCC2、NKCC1) の形態学的定量解析を海馬において免疫染色を用いて行った。また、GABA 受容体のアゴニストであるムシモールによる海馬神経細胞の反応を Ca^{2+} イメージング法にて調べることで、GABA スイッチの時期を解析した。さらに、生後 35 日において顆粒細胞の幼若マーカーであるカルレチニン、成熟マーカーであるカルビンジンの免疫染色を行い、定量解析を行った。思春期相当の生後 35 日から、オープンフィールド試験、新奇物質探索試験、高架十字迷路試験、攻撃行動試験を行った。

【結 果】

生後 7、14、21、35 日の海馬の各領域 (DG、CA3、CA1) における KCC2 の発現を調べたところ、生後 7、35 日の DG を除いて、母子分離群ではコントロール群と比較してその発現が有意に減少していた。しかしながら、NKCC1 の発現は、生後 7、14、21、35 日において、海馬の領域 (DG、CA3、

CA1) すべてでコントロール群と母子分離群で有意差を認めなかった。

Ca²⁺ イメージング法にて GABA スイッチの時期を解析したところ、コントロール群では生後 11 日、母子分離群では生後 15 日にムシモールによる Ca²⁺ 反応がなくなった。

生後 35 日において、幼若マーカーであるカルレチニンはコントロール群と比較して母子分離群で増加しており、成熟マーカーであるカルビンジン母子分離群で減少していた。

オープンフィールド試験において、コントロール群と比較して母子分離群でフィールドにおける移動距離が増加していた。新奇物質探索試験において、総探索時間がコントロール群と比較して、母子分離群で増加したにも関わらず、識別率は母子分離群で減少していた。高架十字迷路試験において、オープンアームへの進入時間と進入回数はコントロール群と比較して母子分離群で増加していた。攻撃行動試験において、咬む強さと咬む回数はコントロール群と比較して母子分離群で増加していた。

【結論及び考察】

免疫染色および Ca²⁺ イメージング法の結果から、母子分離群は生後 7、14、21 日の海馬において GABA スイッチに必須な KCC2 が減少しており、GABA スイッチが遅れていた。また、母子分離群は生後 35 日においても KCC2 が減少しており、GABA スイッチ終了後も GABA 抑制系機能の異常が示唆された。また、NKCC1 については母子分離群とコントロール群で有意差を認めず、母子分離による幼少期ストレスの影響は NKCC1 よりも KCC2 に関与していることが考えられた。思春期相当の生後 35 日から行動試験を行ったが、母子分離群においてオープンフィールド試験から多動、新奇物質探索試験から認知機能の低下、高架十字迷路試験から注意力の欠陥といった行動異常を認めた。これらの結果から、GABA スイッチの遅れが脳機能発達障害を起し、発達障害様行動が現れた可能性が示唆された。

(Biochemical and Biophysical Research Communications 2017 IN PRESS)